

8

06-133782

(43)Date of publication of application : 17.05.1994

C12N 15/75
C12N 1/21
C12N 15/56
//(C12N 1/21
C12R 1:08)

(71)Applicant : HIGETA SHOYU CO LTD
UDAKA JUZO

(72)Inventor : EBISU SHIYOUGO
TAKAGI HIROAKI
UDAKA JUZO

(57)Abstract:

CONSTITUTION: A high-expression vector pHT having HWP promoter and a multicloning site of formula, e.g. pHT210. A plasmid having a DNA fragment produced by linking an α -amylase (BLA) gene of *Bacillus licheniformis* to the downstream of an MWP promoter region of *Bacillus brevis* 47 (FERM P-7224) is treated with a restriction enzyme, the HWP promoter region fragments extracted from the plasmid are linked together, a *Bacillus brevis* is transformed to obtain a plasmid containing HWP promoter in place of MWP promoter and the obtained plasmid is subjected to restriction enzyme treatment, ligase treatment and linker treatment to obtain a high-expression vector free from BLA gene.

[illegible]

[Date of request for examination] 28.03.1995

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2727391

[Date of registration] 12.12.1997

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

8

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-133782

(43)公開日 平成 6 年(1994) 5 月17日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/75	Z N A	7236-4B		
1/21				
15/56				
// (C 1 2 N 1/21		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
			審査請求 未請求 請求項の数 8 (全 8 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-216605

(22)出願日 平成 4 年(1992) 7 月23日

(71)出願人 000112060

ヒゲタ醤油株式会社

東京都中央区日本橋小網町 2 番 3 号

(71)出願人 000120205

鵜高 重三

愛知県名古屋市名東区植園町 1 丁目24番地の 3

(72)発明者 恵 比 須 省 吾

千葉県銚子市清水町2798- 1

(72)発明者 高 木 広 明

千葉県銚子市清川町 1 - 9 - 16

(72)発明者 鵜 高 重 三

愛知県名古屋市名東区植園町 1 - 24 - 3

(74)代理人 弁理士 戸田 親男

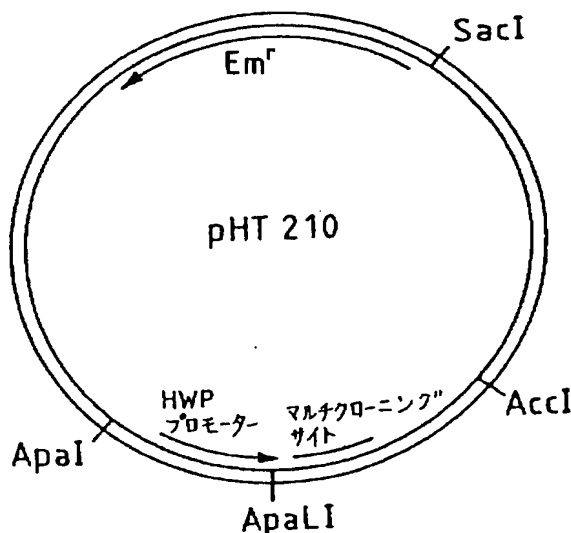
(54)【発明の名称】 高発現ベクター及び該高発現ベクターを微生物を用いる

保有する微生物並びに該有用物質の製造法

(57)【要約】

【構成】 図で表わされる制限酵素切断図を有するプラスミド。このプラスミドは、バチルス・ブレビスHPD 31 (*Bacillus brevis* HPD31) (FERM BP-1087) 由来のHWPプロモーター領域を有する。

【効果】 このプラスミドは、HWPプロモーター領域の下流に目的とする各種の外来遺伝子を挿入して高発現ベクターとして使用できる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 HWPプロモーター及び図8に示すマルチクローニングサイトを有する高発現ベクターpHT。

【請求項2】 図4の制限酵素地図で示される請求項1に記載の高発現ベクターpHT110。

【請求項3】 図7の制限酵素地図で示される請求項1に記載の高発現ベクターpHT210。

【請求項4】 請求項1に記載の高発現ベクターpHTに外来遺伝子を結合してなる高発現ベクターpHTX。

【請求項5】 高発現ベクターpHTXを保有する微生物。

【請求項6】 高発現ベクターpHTXを保有するバチルス・ブレビス (*Bacillus brevis*)。

【請求項7】 高発現ベクターpHTXを保有するバチルス・ブレビスHPD 31 (*Bacillus brevis* HPD 31)。

【請求項8】 高発現ベクターpHTXを保有する微生物を培養することにより外来遺伝子産物を培養物中に生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする該産物の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、バイオテクノロジーに関するものであり、更に詳細には、本発明は、新規高発現ベクター及び高発現ベクターに外来遺伝子を結合してなるベクターをバチルス・ブレビスに保有せしめてなる微生物、並びに該微生物を培養し、培養物中に外来遺伝子産物を生成蓄積せしめこれを採取することを特徴とする該産物の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】鶴高らはバチルス・ブレビス (*Bacillus brevis*) にはプロテアーゼを生産しない菌株が多いことを見だし、その1菌株バチルス・ブレビス47 (FERM P-7224:特開昭60-58074号公報、特開昭62-201589号公報参照)の主要菌体外タンパク質 (H. Yamagataら、J. Bacteriol., 169, 1239 (1987); 塚越規弘、日本農芸化学会誌、61, 68 (1987) および特開昭62-201583号公報にそれぞれ "outer wall protein and middle wall protein"、"主要菌体外タンパク質"として記載されている。) 遺伝子のプロモーターおよび該主要菌体外タンパク質の1種であるMWタンパク質 (middle wall protein) のシグナルペプチドをコードする領域を用いて分泌ベクターを作製し、本菌株を宿主として α -アミラーゼ (特開昭62-201583号公報、H. Yamagataら、J. Bacteriol., 169, 1239 (1987) やブタペシノーゲン (鶴高重三、日本農芸化学会昭和62年度大会講演要旨集、p

837-838; 塚越規弘、日本農芸化学会誌、61, 68 (1987)) の分泌生産に成功している。

【0003】また、高木らはバチルス・ブレビスのプロテアーゼを菌体外に生産しない菌株バチルス・ブレビスHPD31 (なお、この菌株はバチルス・ブレビスH102 (FERM BP-1087) と同一菌株である) を分離し、これを宿主として耐熱性 α -アミラーゼの高分泌生産 (Agric. Biol. Chem., 58, 2779-2380 (1989)) や、山形らによるヒトEGFの高分泌生産 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3589-3593 (1989)) に成功している。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】バチルス・ブレビスを宿主菌とする外来遺伝子産物の生産性については、遺伝子組換え技術を適用する以前の生産量及び大腸菌を宿主菌とする系に比べ飛躍的に向上しているが、産業上必要な量を安価に供給するにはもう一段の技術開発が必要とされている。従来、バチルス・ブレビスを宿主菌とする系で使用しているベクターは、*Staphylococcus aureus*由来のpUB110をベースとするもので、バチルス・ブレビスとの属の違いなどから菌体内に安定に保持することが困難であり、その結果、宿主の能力を十分に引き出すことが出来ず、目的遺伝子産物の生産が少ないと言うことが頻繁に認められ、より安定でかつ宿主菌と適合性、調和性のよいベクターの開発が望まれていた。

【0005】

【課題を解決するための手段】上記した業界のニーズに加え、更に、バチルス・ブレビスが汎用性の高い宿主として利用可能であること、また同菌がコンピテントな菌を冷凍保存できること、そしてまた電気パルス法等により形質転換が容易であること等に鑑み、バチルス・ブレビスの工業的有用性に着目して、バチルス・ブレビスで安定でかつ高発現のベクターを開発すべく鋭意検討した結果、バチルス・ブレビス由来のプラスミドを利用し、且つ、バチルス・ブレビス由来の強力なプロモーターを用いて非常に有効なベクターを構築することに成功し本発明を完成した。

【0006】すなわち本発明は、バチルス・ブレビスで高発現するベクターに関するものである。また更に、本発明はこのベクターに目的とする外来遺伝子を連結してなる高発現ベクター、それを保有する形質転換体、及びこの形質転換体を培養することによる外来遺伝子産物の大量分泌生産方法にも関するものである。以下、本発明について詳しく説明する。

【0007】本発明の高発現ベクターの構築に使用するプラスミドはバチルス・ブレビス由来のプラスミドであれば何れでも良いが、例えば、バチルス・ブレビスHP926 (FERM P-12664) より調製されるプ

ラスミドpHT926が有効に使用される。プラスミドの調製は既知の方法例えば田中らの方法(J. Bacteriol., 129, 1487-1494 (1977))が挙げられる。

【0008】プロモーターとしてはバチルス・プレビスで機能するものであれば何れでも良いが、バチルス・プレビス由来のプロモーターが好ましく、例えばバチルス・プレビスHPD31 (FERM BP-1087) の主要菌体外タンパク質遺伝子 (HWP遺伝子) のプロモーターなどが挙げられる。プロモーター領域を含有するDNAは上記プロモーター以外にSD配列、翻訳開始コドンなどを有していることが必要である。

【0009】上記のように、バチルス・プレビスHPD31のHWPプロモーター領域を含有するDNAは既知であるので(J. Bacteriol., 172, 1312-1320 (1990))、必要部分を制限酵素で切断しておき、これをサブクローニング用ベクター (形質転換体としてE. coliを用いる場合には、pUC118、pUC119等のpUC系プラスミド又はpBR322系のプラスミドが好適である) に挿入し、そのDNAでE. coliを形質転換しておけば、目的とするプロモーター領域を含有するDNAが保存される。したがって必要ある場合に、形質転換体からプラスミドを取り出し、必要あれば更に制限酵素処理、リンカー処理等を行ってプラスミドを調製しておけば、目的とするプロモーターを含むDNA断片を自由に取り出すことができる。

【0010】また、本発明の高発現ベクターに連結する外来遺伝子はバチルス・プレビスで発現可能な遺伝子であれば何れでも良く、例えば、Bacillus licheniformisの α -アミラーゼ遺伝子、ヒトEGF遺伝子等が挙げられる。

【0011】プラスミドを構築する方法としては、常法で適宜用いられ、例えばモレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982) に記載の方法などが例示される。

【0012】バチルス・プレビス47 (FERM P-7224) のMWPプロモーター領域の下流にバチルス・リケニフォルミス (B. licheniformis) の α -アミラーゼ (BLA) 遺伝子を連結したDNAフラグメントを保有するプラスミドは既知であるので(J. Bacteriol., 169, 1239-1245 (1987))、これを制限酵素処理した後、上記によって調製したプラスミドから取り出したHWPプロモーター領域断片をつないでバチルス・プレビスを形質転換して、MWPプロモーターがHWPプロモーターにかわったプラスミドを得る。このプラス

ミドを制限酵素処理、リガーゼ処理、リンカー処理することによってBLA遺伝子領域を除去した本発明の目的とする高発現ベクターpHTが得られる。

【0013】このようにして調製した高発現ベクターpHTのHWPプロモーター、シグナルペプチドの下流側に、目的とする外来遺伝子を常法にしたがってin frame挿入し、微生物を形質転換すれば、外来遺伝子を多量に分泌生産しうる形質転換体を得ることができる。

【0014】外来遺伝子を組み込んだベクターを形質転換する微生物としては、バチルス・プレビスに属する微生物であれば何れでも良く、例えば、バチルス・プレビス47 (FERM P-7224)、バチルス・プレビスHPD31 (FERM BP-1087) が挙げられるが、好適にはバチルス・プレビスHPD31が用いられる。バチルス・プレビスを形質転換する方法は、公知の方法で良く、例えば、Takahashiらの方法(J. Bacteriol., 156, 1130 (1983)) またはTakagiらの方法(Agric. Biol. Chem., 53, 3099-3100 (1989)) 等が例示される。

【0015】得られた形質転換体の培養に用いる培地は、形質転換体が生育して目的とする外来遺伝子産物を産生しうるものであれば如何なるものでも良い。

【0016】該培地に含有される炭素源としては、例えばグルコース、シュークロース、グリセロール、澱粉、デキストリン、糖蜜、尿素、有機酸などが考えられる。該培地に含有させる窒素源としては、カゼイン、ポリペプトン、肉エキス、酵母エキス、カザミノ酸、グリシンなどの有機窒素源、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムなどの無機窒素源などが用いられる。その他、塩化カリウム、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウムなどの無機塩が必要に応じて培地に加えられる。また、糖と無機窒素源を主とする合成培地を用いて培養しても良い。栄養要求性を示す菌は、その生育に必要な栄養物質を培地に添加すればよい。該栄養物質としては、アミノ酸類、ビタミン類、核酸、塩類などが挙げられる。

【0017】また、培養に際して必要があれば、培地に抗生物質例えばペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、バシトラシン、D-サイクロセリン、アンピシリンなどが加えられる。更に必要により、消泡剤例えば大豆油、ラード油、各種界面活性剤などを培地に加えてもよい。

【0018】培地の初発pHは5.0~9.0であり、さらに好ましくは6.5~7.5である。培養温度は通常15℃~42℃、さらに好ましくは24℃~37℃であり、培養時間は通常16~166時間、さらに好ましくは24~96時間である。

【0019】培養終了後、それ自体公知の方法、例えば

遠心分離、ろ過などで菌体と上清とを分離する。

【0020】形質転換する微生物として、例えばバチルス・ブレビスHPD31等を使用すれば、電気パルス法等によって容易に形質転換することができるのみでなく、目的とする産物を菌体外に生産するというすぐれた性質を有しているため、上記のようにして得られた培養上清に含まれる外来遺伝子産物は、例えば塩析、等電点沈澱、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイト、高速液体クロマトグラフィーなどに従って精製すればよく、このようにして目的とする外来遺伝子産物を容易に得ることが出来る。

【0021】以下、本発明を実施例により更に詳しく説明する。

【0022】

【実施例1】

【0023】〔(1) プラスミドpHT926の単離(図1)〕プラスミドpHT926は、*Bacillus brevis* HP926 (FERM P-12664) が保有する多コピープラスミドである。本菌株をT2液体培地(Agric. Biol. Chem., 40, 523 (1976)) 中で37℃で1晩振とう培養後、培養液から菌体を遠心分離にて集め、次いで集菌した菌体よりアルカリ・SDS法(Nucleic Acids Res., 7, 1513 (1979)) によりプラスミドpHT926を得た。pHT926は、アガロースゲル電気泳動上で約1.8Kbのプラスミドであり、その制限酵素地図を図1に示す。

【0024】〔(2) pHT926を用いた*B. brevis* 47B. *brevis* HPD31の形質転換(図2、図3)〕プラスミドpE194(J. Bacteriol., 150, 2, 804-814 (1982)) をSacIとClaIで消化し、エリスロマイシン耐性遺伝子(Em^r遺伝子)を含む960bpのSacI-ClaI断片を得、プラスミドpUC119のSacI-AccI部位に挿入、結合した後、*E. coli* JM109を形質転換し、pUC119・Em^rプラスミドを有する株を選択した。本菌株よりプラスミドpUC119・Em^rを調製し、このプラスミドをEcoRIとHindIIIで処理し、Em^r遺伝子を含む980bpのEcoRI-HindIII断片を得た。この断片の両端をDNAポリメラーゼ(Klenow fragment)により平滑化し、pHT926のHpaI部位に挿入、結合し、プラスミドpHT100を得た。これを用いて*B. brevis* 47をTris-PEG法(J. Bacteriol., 156, 1130 (1983)) により、そしてまた*B. brevis* HPD31をエレクトロポレーション法(Agric. Biol. Chem., 53, 3099 (1989)) により、形質転換を試みた。

【0025】形質転換処理を行った菌体をEmを含むT

2固体培地(プレート)に塗布し、37℃で2日間培養したところ、プレート上に生育するコロニーが高頻度で得られた。T2・Emプレート上の生育コロニーを液体培養し、菌体よりプラスミドを調整した。得られたプラスミドは、宿主が*B. brevis* 47、*B. brevis* HPD31のいずれにおいても、pHT926にEm^r遺伝子が挿入された目的どおりのもの(pHT100)を有していた(図2、図3)。以上より、pHT926は*B. brevis* 47及び*B. brevis* HPD31において複製可能なプラスミドであることが立証された。

【0026】〔(3) 高分泌発現ベクターpHT110構築(図4)〕pHT100をApaIで消化後、DNAポリメラーゼにて切断部分を平滑化し、次いでこの部分をT4リガーゼにより連結し、ApaIサイトを欠失せしめたpHT100Aを得た。そして、*B. brevis* HPD31のHWPプロモーター、シグナルペプチド及び構造遺伝子の一部を含むファージDNAφSK-10(J. Bacteriol., 172, 1312 (1990)) より、HWPプロモーター及びシグナル部分の500bp PstI-HpaI断片を得た。一方、図5に示す*B. brevis* 47のMWPシグナルペプチドの一部及びマルチクロニングサイトを含む110bp HpaI-PstI断片を合成した。

【0027】pHT100AをPstIで消化した後、上記によって得た2つの断片をT4リガーゼによって連結し、目的とする分泌ベクターpHT110を得た。

【0028】pHT110のマルチクロニングサイトに外來遺伝子をアミノ酸の読み取りが合う様に(in frame)挿入し、*B. brevis* HPD31を形質転換することによってプラスミドpHT110Xを保有し目的遺伝子産物を多量に分泌生産する組換え体を得た。

【0029】〔(4) 高分泌発現ベクターpHT210の構築(図6、図7)〕*Bacillus brevis* 47 (FERM P-7224) のMWPプロモーター及びシグナルペプチド(J. Bacteriol., 169, 1239-1245 (1987)) の下流に*B. licheniformis* のα-アミラーゼ(BLA) 遺伝子(J. Biochem., 96, 1147-1156 (1985)) を直結し、*B. brevis* 481 (FERM P-7531) から単離した*B. brevis* で安定に保持されるプラスミドpHY481 (Appl. Env. Microbiol., 49, 1076-1079 (1985)) に挿入し、プラスミドpHY4831 (J. Bacteriol.) 169, 1239-1245 (1987)) を調製した。pHY4831より特願平3-123183号の方法にしたがって調製したプラスミドpHY4831HをPstIとB

cllで消化し、HWPプロモーターと*B. licheniformis*の α -アミラーゼ遺伝子(BLA遺伝子)が直結した2.2kbのPstI-BclI断片を得た。

【0030】次いで、この断片の両端をDNAポリメラーゼを用いて平滑化した。前項で得たpHT100をApaLIで消化後DNAポリメラーゼにて切断部分を平滑化し、この部分に先に得た2.2kbのHWPプロモーターBLA遺伝子断片をT4リガーゼを用いて連結し、pHT200・BLAを得た。pHT200・BLAをSalIで消化後DNAポリメラーゼで平滑末端化した後、EcoRIリンカーを付加したpHT200Eを得た。pHT200EをPstIで消化後、DNAポリメラーゼにより平滑末端化した後T4リガーゼにてその平滑末端部分を連結し、PstI切断点を無くし、次いでApaLIとEcoRIで消化して、4.0kbのApaLI-EcoRI断片を得た。この4.0kb ApaLI-EcoRI断片に図8に示す合成ヌクレオチド90bp ApaLI-EcoRI断片を連結し、pHT210を得た(図7)。pHT210のマルチクローニングサイト部分に外来遺伝子をアミノ酸の読み取りが合う様に(in frame)挿入し、*B. brevis* HPD31を形質転換することにより、プラスミドpHT210Xを保有し目的遺伝子産物を多量に分泌生産する組換え体を得た。

【0031】[実施例2]

【0032】[(5) pHT110・BLAの構築(図9)] pHY4831をApaLIとBclIで消化して、MWPのシグナルペプチドの一部と*B. licheniformis*の α -アミラーゼ遺伝子とを含む1. *30

BLAの生産

	3	6(日)
<i>B. brevis</i> HPD31	0	0
<i>B. brevis</i> HPD31/pHT110 BLA	2.6	4.5($\times 10^6$ U/ml)
<i>B. brevis</i> HPD31/pHT210 BLA	2.8	4.5($\times 10^6$ U/ml)

【0037】培養上清から α -アミラーゼを山形らの方法(J. Bacteriol., 169, 1239-1245 (1987))に従い、SDS・PAGE上一本のバンドになるまで精製を行った。本アミラーゼ精製品の比活性は 1×10^6 U/mg proteinであり、上記培養液(pHT110・BLA-6日、pHT210・BLA-6日)にはそれぞれ4.5g/Lのアミラーゼが分泌されていることになる。

【0038】[実施例4]

【0039】[(8) pHT110・EGFの構築(図12)] 図11に示すMWPシグナルペプチドの一部及

*7kb ApaLI-BclI断片を得た。一方、pHT110をApaLIとBamHIで消化して、2.8Kb ApaLI-BamHI断片を得た。この断片と先に得た1.7Kb断片とをT4リガーゼで連結し、*B. brevis* HPD31を形質転換した。組換え体よりプラスミドpHT110・BLAを得た。

【0033】[(6) pHT210・BLAの構築(図10)] pHY4831をApaLIとBclIで消化し、MWPのシグナルペプチドの一部と*B. licheniformis*の α -アミラーゼ遺伝子を含み1.7kb ApaLI-BclI断片を得た。pHT210をApaLIとBamHIで消化し、3.9kb ApaLI-BamHI断片を得、これと先に得た1.7kb断片をT4リガーゼにて連結し、*B. brevis* HPD31を形質転換した。組換え体よりプラスミドpHT210・BLAを得た。

【0034】[実施例3]

【0035】[(7) pHT110・BLA、pHT210・BLAを用いてのBLAの分泌生産] pHT110・BLA、pHT210・BLAを保持する*B. brevis* HPD31を5' PY培地(Agric. Biol. Chem., 53, 2279 (1989))に接種し、30℃で6日間振とう培養した。この培養液を遠心分離し、その上清のアミラーゼ活性を可溶性澱粉を基質として斎藤の方法(Arch. Biochem. Biophys., 155, 290 (1973))を用いて測定し、下記表1の結果を得た。

【0036】

【表1】

びEGF構造遺伝子部分を含む194bp ApaLI-BamHI断片を合成した。pHT110をApaLIとBamHIで消化して、3.35kb ApaLI-BamHI断片を得、これと上記によって合成した194bp断片とをT4リガーゼを用いて連結し、*B. brevis* HPD31を形質転換した。組換え体よりプラスミドpHT110・EGFを得た。

【0040】[実施例5]

【0041】[(9) pHT110・EGFを用いてのh-EGFの生産] pHT110・EGFを保持する*B. brevis* HPD31及び対照となる*B. br*

ev is HPD31を5' PY培地を用いて30℃で6日間振とう培養を行った。その培養液を遠心分離し、上清のヒトEGF濃度を抗ヒトEGF血清を用いたEL*

*ISA法により求めた。その結果を下記の表2に示す。

【0042】

【表2】

h-EGFの生産

	2	4	6(日)
B.brevis HPD31	0	0	0
B.brevis HPD31/pHT110 EGF	1.46	2.27	3.29(g/L)

【0043】

【発明の効果】本発明により、バチルス・プレビス由来の高発現ベクターを開発した。この高発現ベクターは目的とする外来遺伝子を挿入することが可能であるので、このベクターにより形質転換した微生物を培養することにより、目的とする各種の外来遺伝子産物を菌体外に著量分泌生産することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】pHT926の制限酵素地図である。

【図2】pHT100の構築図である。

【図3】pHT100の制限酵素地図である。

【図4】pHT110の構築図である。

※【図5】マルチクローニングサイトを有する110bp合成ヌクレオチドを示す。

【図6】pHT210の構築図である。

【図7】pHT210の制限酵素地図である。

【図8】マルチクローニングサイトを有する194bp合成ヌクレオチドを示す。

【図9】pHT110 BLAの構築図である。

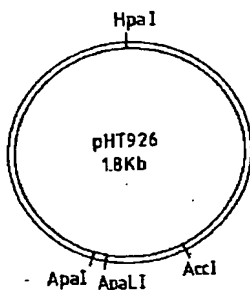
【図10】pHT210 BLAの構築図である。

【図11】ヒト-EGF構造遺伝子に相当する合成ヌクレオチドを示す。

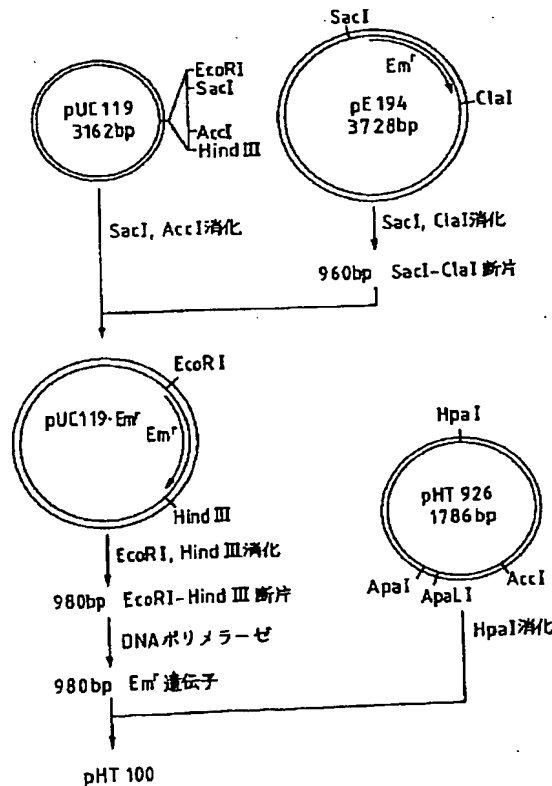
【図12】pHT110 EGFの構築図である。

※

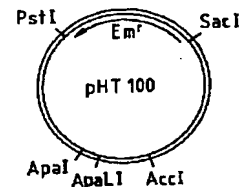
【図1】



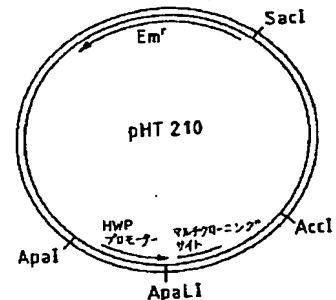
【図2】



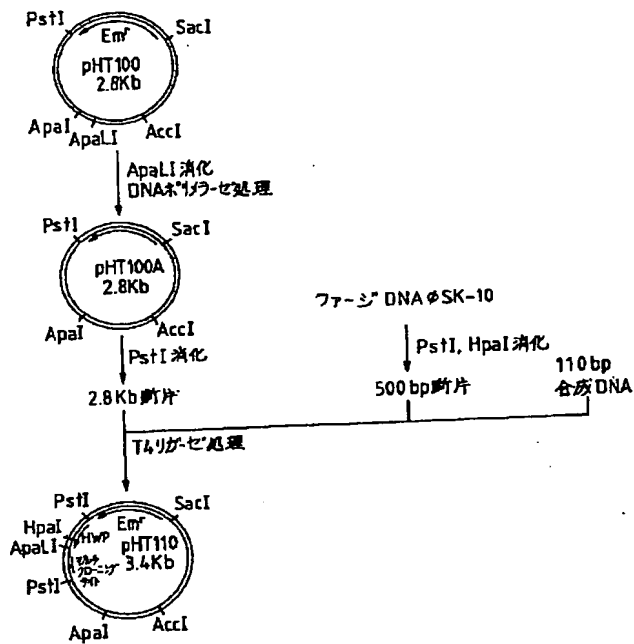
【図3】



【図7】



【図4】



【図5】

ApaI
 AACAGTGTATTGGCTAGTGCACCTCGCACCTGTTGCTCCCATGGCTTTCGCTGCAGGATCCG
 TTGTCACATAACCGATCACGTGAGCGTTGACAACGAGGGTACCGAAAGCGACGTCTTAGGC

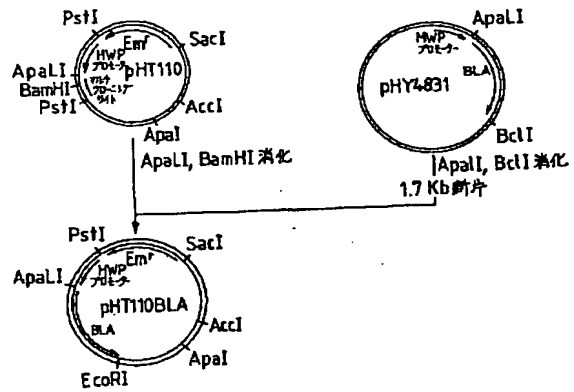
Sali XbaI KpnI BglII SacI XhoI HindIII EcoRI PstI
 GTCGACTCTAGAGGTACCGATCTCTCGAGGAGCTCAAGCTTGAATTCTGCA
 CAGCTGAGATCTCCATGGTCTAGAGAGCTCCTCGAGTTCGAACCTTAA

【図8】

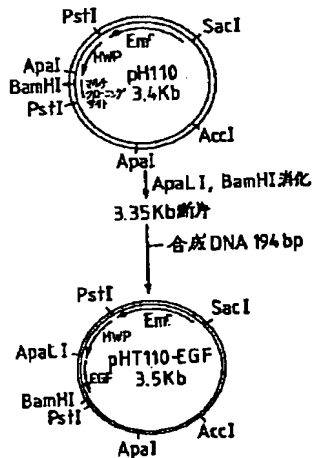
ApaI
 TGCACCTCGCAACTGTTGCTCCCATGGCTTTCGCTGCAGGATCCGTCGACTCTAGAGGTACC
 GAGCGTTGACAACGAGGGTACCGAAAGCGACGTCTTAGGCAGCTGAGATCTCCATGG

BglII SacI XhoI HindIII EcoRI
 AGATCTGAGCTCTCGAGAGCTTG
 TCTAGACTCGAGGAGCTCTTGAACCTTAA

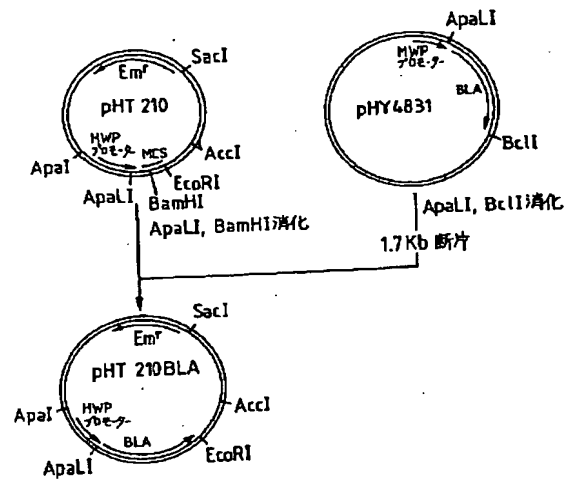
【図9】



【図12】



【図 10】



【图 11】

TGGGAAGTGCCTAG
ACCTTGACGCAATCCTAG

技術表示箇所